

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

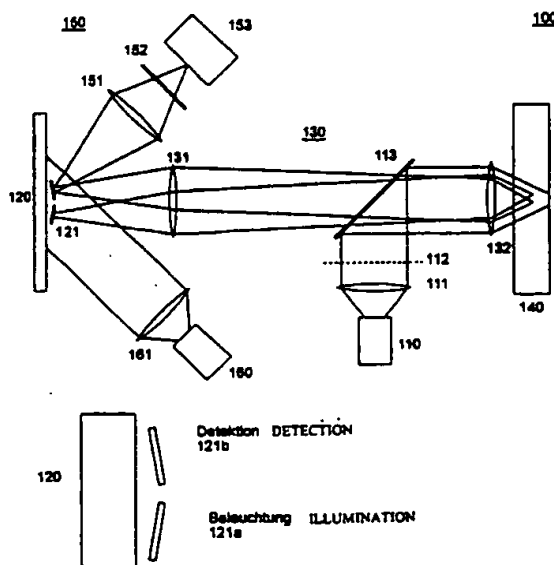
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/44852 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G02B 21/00 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/12120 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KIRSCH, Achim
(22) Internationales Anmeldedatum: 1. Dezember 2000 (01.12.2000) [DE/DE]; Langenfelder Damm 70, 22525 Hamburg (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch MÜLLER, Jürgen [DE/DE]; Lohbellstieg 32f, 22529 Hamburg (DE).
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).
(30) Angaben zur Priorität: 199 60 583.1 15. Dezember 1999 (15.12.1999) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE). (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROSCOPY METHOD AND DEVICE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR MIKROSKOPIE



(57) Abstract: The invention provides that in order to optically image a sample (140) in three-dimensions, the entire sample (140) is uniformly illuminated, a conventional first partial image is recorded, and the sample (140) is subjected to a laterally structured illumination in a focal plane. The illumination of the individual points of the focal plane is varied according to predetermined temporal sequences. A second partial image is recorded by detecting the light emitted by the object points that are not illuminated in the confocal plane. An image of the probe (140) that is spatially resolved in three-dimensions is established from the first and second partial images. The invention also relates to optical imaging systems used for carrying out this imaging method.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/44852 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Zur dreidimensionalen optischen Abbildung einer Probe (140) erfolgen eine gleichmäßige Beleuchtung der gesamten Probe (140) und Aufnahme eines konventionellen ersten Teilbildes, eine lateral strukturierte Beleuchtung der Probe (140) in einer Fokalebene, bei der die Beleuchtung der einzelnen Punkte der Fokalebene nach vorbestimmten zeitlichen Sequenzen variiert wird, und Aufnahme eines zweiten Teilbildes durch Erfassung des von den in der Konfokalebene jeweils nicht beleuchteten Objektpunkten emittierten Lichtes, und eine Ermittlung eines dreidimensional räumlich aufgelösten Bildes der Probe (140) aus den ersten und zweiten Teilbildern. Es werden auch optische Abbildungssysteme zur Durchführung dieses Abbildungsverfahrens beschrieben.

Verfahren und Vorrichtung zur Mikroskopie

Die Erfindung betrifft ein Mikroskopieverfahren zur Erzeugung dreidimensional räumlich aufgelöster optischer Abbildungen einer Probe, insbesondere ein Mikroskopieverfahren unter Verwendung eines Mikroskops mit einem lateralen Beleuchtungsmodulator. Die Erfindung betrifft ferner optische Abbildungssysteme zur Gewinnung dreidimensional räumlich aufgelöster Abbildungen einer Probe.

Bisher bekannte Verfahren zur dreidimensional auflösenden Abbildung einer Probe basieren auf dem Prinzip der Konfokalmikroskopie. Bei diesen Verfahren wird die Probe punktwise beleuchtet und das aus den jeweils beleuchteten Probenpunkten emittierte Licht detektiert. Es kann im wesentlichen zwischen zwei Klassen von Konfokalmikroskopen unterschieden werden.

Zum einen gibt es Mikroskope, die strikt konfokal arbeiten. Dabei werden ein oder mehrere wohl getrennte Punkte in der Probe beleuchtet. Die Detektion erfolgt über eine oder mehrere Aperturen, die sich in zu den beleuchteten Probenpunkten konjugierten Bildpunkten befinden. Die zu beleuchtenden Punkte in der Probe sind so weit voneinander entfernt zu wählen, daß durch jede Detektionsapertur nur Licht aus dem dazu konjugierten Probenpunkt durchtritt. Dadurch ergibt sich, daß das Signal im Wesentlichen aus den Probenpunkten in der Fokalebene entsteht. Zur Aufnahme eines Gesamtbildes wird die Probe mit der punktförmigen Beleuchtung und Detektion abgetastet. Die Zuordnung von beleuchtetem Punkt zu Detektionsapertur erfolgt ausschließlich aus der Korre-

lation der räumlichen Anordnung. Als Abtastsysteme finden hierbei rotierende Aperturscheiben (sog. Nipkow-Scheiben), mechanisch bewegte Spiegel oder Mikrospiegelanordnungen (Patent US 5,923,466) Anwendung. Daß die zu beleuchtenden Punkte weit voneinander entfernt sind, führt dazu, daß die Lichtausbeute gering ist. So erreichen nur ca. 2-3% des Anregungslichtes die Probe und zudem ist die Datenaquisitionsrate durch die Notwendigkeit des Abrasterns und der nur gering möglichen Parallelisierung limitiert.

Die Entwicklung einer zweiten Klasse von Konfokalmikroskopen, die die strikte räumliche Trennung der einzelnen beleuchteten Probenpunkte aufgeben, wie sie von R. Juškaitis et al. in „Nature“ (Band 383, 1996, Seite 804 ff), T. Wilson et al. in „Optics Letters“ (Band 21, 1996, Seite 1879 ff), in der Patentanmeldung WO 97/31282 und in dem EP 0 911 667 A1 beschrieben werden, ermöglichte eine Erhöhung der Lichtausbeute. Bei diesen Mikroskopen werden die einzelnen Bildpunkte nicht mehr nur räumlich unterschieden, sondern die zeitliche Abfolge, mit der die optischen Eigenschaften der lokalen Beleuchtung variieren, wird verwendet, die Zuordnung zwischen beleuchtetem Punkt und Detektionsapertur vorzunehmen. Dadurch ist es möglich, von jedem Punkt während 50 % der Meßzeit Signale aufzuzeichnen. Idealerweise wird hierzu die Beleuchtung jeden Punktes mit einer anderen zeitlichen Abfolge derart moduliert, daß keine Korrelation mit den zeitlichen Abfolgen der Beleuchtung aller anderen Punkte auftritt. Hierzu ist es notwendig für jeden Punkt unabhängige Zufallsfolgen zu wählen. Alternativ können zur Modulation der zeitlichen Abfolgen Sätze von endlich langen Folgen mit verschwindender Korrelation, wie z. B. komplementäre Golay Sequenzen oder Hadamard-Sequenzen vom S-Matrix-Typ, die aus maximal so vielen Elementen bestehen, wie die Sequenzen lang sind, ausgewählt werden. Häufig genügt es, da das Übersprechen zwischen zwei Punkten

mit der Entfernung abnimmt, mit kurzen Sequenzen nur die Korrelation zwischen nahe beieinander liegenden Punkten aufzuheben. Da diese Sequenzen auch negative Werte enthalten, die rein optisch in einer Transmissionsmaske nicht umsetzbar sind, muß der Sequenz ein Gleichanteil hinzugefügt werden. Dies führt dazu, daß das gemessene optische Bild die Überlagerung eines konfokalen mit einem konventionellen Bild ist.

Ein bei dieser Klasse von Konfokalmikroskopen auftretender Nachteil ist der durch die Überlagerung von konfokalem und konventionellem Signal erforderliche Kontrastumfang des Detektors. Bei vergleichbarem Signalanteil von konfokalem und konventionellem Bild muß der Detektor im Vergleich zum gewünschten konfokalen Signal das Doppelte an Gesamtsignal verarbeiten können.

Nachteil beider Klassen der Konfokalmikroskope ist, daß sich die Beleuchtungs- und Detektions-Strahlengänge für die jeweils betrachteten Bildpunkte überlagern und sie daher aufwendig, z. B. im Falle der Fluoreszenzmessung mit dichroitischen Strahlteilern, getrennt werden müssen. Diese Trennung führt im Falle von Fluoreszenzmessungen zu einer erheblichen Verringerung der zu detektierenden von der Probe emittierten Fluoreszenzstrahlung und zudem sind für unterschiedliche Fluoreszenzanwendungen unterschiedliche dichroitische Strahlteiler notwendig. Die bei der Durchführung von elastischen Streumessungen und Reflexionsmessungen notwendigen Strahlteiler verringern die Intensität sowohl des eingestrahlten als auch des emittierten Lichtes um typischerweise 50%.

Ein weiterer Nachteil der Konfokalmikroskope ist die Detektion des konfokalen Signals nur aus einer Teilmenge aller Bildpunkte. Bei konfokal arbeitenden Mikroskopen werden nur

aus etwa 2 % (oder sogar weit darunter) bis maximal 50 % der Fläche der Fokalebene gleichzeitig Signale aufgezeichnet. Dadurch ist die gemessene Intensität im Vergleich zur zeitlich gemittelten Intensität bis zu einem Faktor von 50 (oder darüber) größer. Um mit diesen Verfahren eine hohe Datenaquisitionsrate zu erzielen, muß generell mit einer sehr hohen lokalen Anregungsintensität gearbeitet werden. Allerdings gewinnen hierbei nichtlineare Prozesse wie die Anreicherung der Farbstoffmoleküle in Triplettzuständen an Bedeutung, die einen negativen Einfluß auf die Signalintensität haben.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur dreidimensionalen räumlich auflösenden Mikroskopie und Mikroskope zur Implementierung dieses Verfahrens anzugeben, mit denen sowohl eine hohe Lichtausbeute als auch eine hohe Datenaquisitionsrate ohne die vorgenannten Nachteile erzielt werden können.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen gemäß Anspruch 1 und durch die Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Ansprüchen 9, 14 bzw. 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Gemäß einem ersten Gesichtspunkte der Erfindung wird ein optisches Abbildungsverfahren beschrieben, bei dem zunächst ein konventionelles erstes Teilbild einer Probe aufgezeichnet wird. Unter einem konventionellen Bild wird hier die lichtmikroskopische Abbildung des gesamten betrachteten Probenbereiches verstanden. Das erste Teilbild enthält neben Signalanteilen aus der Fokalebene auch Störsignale, die sich daraus ergeben, daß Licht, welches außerhalb der Fokalebene emittiert oder gestreut wird, oder Licht nach mehrfacher Streuung inner- und außerhalb der Fokalebene den

Detektor erreicht. Die Fokalebene ist die Bildebene, auf die das Mikroskop zur Probenabbildung fokussiert ist. Des weiteren wird an der Probe ein zweites Teilbild aufgenommen, welches nur die unerwünschten Störanteile enthält. Dazu wird die Probe mit lateral strukturierter Beleuchtung beleuchtet und vollständig abgetastet. Dabei wird jeweils nur aus gerade nicht beleuchteten Probenpunkten das optische Signal aufgezeichnet. Das gewünschte dreidimensional räumlich aufgelöste Bild wird schließlich durch Kompensation der Störanteile im ersten Teilbild mit Hilfe des zweiten Teilbildes erhalten. Das dreidimensionale räumliche aufgelöste Bild besitzt eine Ortsauflösung in der Bildebene und senkrecht dazu.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung eines optischen Abbildungssystems mit mindestens einer Lichtquelle zur Probenbeleuchtung, einer Vorrichtung zur Aufzeichnung eines ersten konventionellen Teilbildes der Probe, einem lateralen Beleuchtungsmodulator zur strukturierten Beleuchtung der Probe in der Fokalebene und einer Einrichtung zur Übertragung von Licht aus nicht-beleuchteten Probenbereichen zu einer Detektoreinrichtung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Beleuchtungsmodulator durch einen DMD (Digital Mirror Device) oder einen LCD (Liquid Crystal Device) gebildet, die zur strukturierten Beleuchtung der Probe in der Fokalebene entsprechend einem vorbestimmten Zeitmuster angesteuert werden. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die strukturierte Beleuchtung durch eine teilweise reflektierende oder transmittierende Maske, die z.B. durch Rotation oder Translation bewegt wird. Für die Strukturierung der Maske bzw. für das zur Ansteuerung des Beleuchtungsmodulators verwendete Verfahren kann auf Muster zugegriffen werden, wie sie aus der inter-

nationalen Anmeldung WO 97/31282 oder der europäischen Anmeldung EP 0 911 667 A1 bekannt sind.

Gemäß weiterer Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Abbildungssysteme werden die Beleuchtungsmodulatoren in Abhängigkeit von der Probe in Reflexion oder Transmission eingesetzt, arbeiten die Abbildungssysteme in Reflexions- oder Transmissionsgeometrie und sind ein oder zwei Lichtquellen mit jeweils angepaßten Beleuchtungsoptiken vorgesehen.

Die Erfindung besitzt folgende Vorteile. Der Aufbau des Mikroskops wird vereinfacht. Bei Aufnahme des zweiten Teilbildes mittels strukturierter Beleuchtung kann auf verlustbehaftete und anwendungsspezifische dichroitische Strahlteiler verzichtet werden, da sich die Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengänge nicht überlagern. Zur Aufnahme des konventionellen ersten Teilbildes kann ein 50%-Strahlteiler eingesetzt werden, der nahezu unabhängig von der Wellenlänge etwa 50% des einfallenden Lichtes reflektiert und etwa 50% transmittiert. Damit ist bei den bevorzugten Ausführungen der strukturierten Beleuchtung, bei denen jeder Bildpunkt zu 50% der Belichtungszeit beleuchtet wird und während der anderen 50% der Zeit davon Licht detektiert wird, die Beleuchtungs- und Abbildungseffizienz für beide Teilbilder gleich.

Ein weiterer Vorteil gegenüber der zweiten Klasse von Konfokalmikroskopen ergibt sich daraus, daß an den Kontrastumfang des Detektors geringere Anforderungen als bei den herkömmlichen Techniken gestellt werden können, denn im Gegensatz dazu bestehen die zwei aufzuzeichnenden Teilbilder entweder aus einem konventionellen Bild oder aus den in diesem Bild enthaltenen Hintergrundanteilen. Die Skalierung des Signals auf dem Detektor kann sich somit an der Inten-

sität des konventionellen Bildes orientieren und muß nicht weitere dazu addierte Signalanteile berücksichtigen.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich daraus, daß Signale aus Probenbereichen aufgezeichnet werden, die nicht mit der maximalen Intensität bestrahlt werden. Nichtlineare Effekte, wie z.B. die Anreicherung in Triplettzuständen, die bei Farbstoffen unter hoher Anregungsintensität vermehrt auftreten, und so das Fluoreszenzsignal verringern, werden vermieden. Somit sind auch geringere Anforderungen an die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe zu stellen.

Desweiteren wird zu jedem dreidimensional räumlich aufgelösten Bild ein konventionelles Bild der Probe aufgezeichnet. Damit können verbesserte Rekonstruktionsverfahren, die auf mehreren Bildern der gleichen Probe basieren, wie sie z.B. von P. J. Verveer und T. M. Jovin in „Applied Optics“ (Band 37, Seiten 6240 - 6246, 1998) beschrieben werden, angewendet werden.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindungen werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Figur 1: eine schematische Darstellung des Lichtweges in einem optischen Abbildungssystem gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung mit zwei Lichtquellen,

Figur 2: eine schematische Darstellung des Lichtweges in einem optischen Abbildungssystem gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung mit einer Lichtquelle,

Figur 3: eine schematische Darstellung des Lichtweges in einem optischen Abbildungssystem gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung mit einer rotierenden Maske,

Figur 4: eine schematische Darstellung des Lichtweges in einem optischen Abbildungssystem gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung in einer Transmissionsgeometrie.

Die erfindungsgemäße Abbildungstechnik kann mit Beleuchtungsmodulatoren implementiert werden, die als Durchlichtmodulatoren (z. B. programmierbare Aperturmasken auf der Basis von Flüssigkristallen (LCD) oder mikromechanischen Schaltern), als Reflektionsmodulatoren (z. B. DMD) oder Mischformen davon (z. B. teilreflektierende und -transmittierende Scheiben) ausgeführt sind.

Im folgenden wird in unterschiedlichen Aufbauten auf die Verwendung unterschiedlicher Modulatoren Bezug genommen. Die erläuterten Prinzipien der Erfindung können jedoch in entsprechender Weise auch mit anderen Modulatoren realisiert werden.

Das erfindungsgemäße Abbildungssystem 100 in Figur 1 umfaßt eine erste Lichtquelle 110, einen Beleuchtungsmodulator 120 mit einer Vielzahl von Beleuchtungselementen 121, eine Abbildungsoptik 130, eine Detektoreinrichtung 150 und eine zweite Lichtquelle 160. Das Bezugszeichen 140 verweist auf eine Probe, die mit dem Abbildungssystem 100 abgebildet werden soll.

Als Lichtquellen 110 und 160 sind z. B. gefilterte Weißlichtlampen oder Laserlichtquellen einzusetzen, wobei beide Lichtquellen vorzugsweise die jeweils gleiche Bauart besit-

zen, um beispielsweise in der Probe 140 eine bestimmte Fluoreszenz anzuregen. Von der ersten Lichtquelle 110 wird über eine Feldlinse 111, den Beleuchtungseinkoppler 113 und die Abbildungsoptik 132 ein erster Beleuchtungslichtweg zur gleichmäßigen Beleuchtung der Probe 140 gebildet. Von der zweiten Lichtquelle 160 wird über eine weitere Feldlinse 161, den Beleuchtungsmodulator 120 und die Abbildungsoptik 130 ein zweiter Beleuchtungslichtweg zur Probenbeleuchtung mit lateral variierender Intensität in der Fokalebene gebildet.

Der hier dargestellte Beleuchtungsmodulator 120 ist ein DMD. Der DMD 120 beinhaltet eine Matrixanordnung aus einzelnen, unabhängig voneinander zwischen zwei stabilen Positionen verkippbaren Spiegeln, die die Modulatorelemente bilden und von denen aus Übersichtlichkeitsgründen nur zwei Spiegel 121 jeweils in einer der Schwenkpositionen dargestellt sind (121a und 121b). Die Auslenkung aus der DMD-Fläche hängt von der konkreten Bauart des eingesetzten DMDs ab und kann beispielsweise $\pm 10^\circ$ mit typischen Spiegeldimensionen von rund 16 μm betragen. Der Aufbau und die Steuertechnik von DMDs sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt, so daß sie hier nicht weiter erläutert werden.

Die Abbildungsoptik 130 umfaßt eine erste Feldlinse 131 und ein Objektiv 132. Die Detektoreinrichtung 150 umfaßt eine Abbildungsoptik 151, einen Filter 152 und eine Detektorkamera 153. Mit der Detektorkamera 153 wird wahlweise Licht aus allen Probenbereichen oder nur aus den unbeleuchteten Punkten der Fokalebene aufgenommen. Die Abbildungsoptik 151 kann sowohl mit Linsen als auch mit Spiegeln wie zum Beispiel einem Offner-Triplett entsprechend dem Patent US 3,748,015 oder einer Kombination aus refraktiven und

reflektiven Elementen aufgebaut sein. Aufgrund der Abbildungseigenschaften des Offner-Tripletts ist es beispielsweise für den Einsatz mit einem DMD sehr gut geeignet.

Das Abbildungssystem 130 ist so angeordnet, daß der Beleuchtungsmodulator 120 bei Mikroskopieanwendungen verkleinert reell in die Probe 140 abgebildet wird. Die beiden Schwenkpositionen 121a und 121 b der Spiegel 121 können nach ihrer Funktion zur Beleuchtung bzw. Detektion unterschieden werden. In der Stellung 121a der Spiegel 121 (siehe unteres Teilbild in Fig. 1) leiten diese Licht von der Lampe 110 mit der Abbildungsoptik 130 auf die Probe 140 (Beleuchtung). Im Gegensatz dazu sind die Beleuchtungsmodulatoren in Stellung 121b so ausgerichtet, daß Licht von der Probe 140 zur Detektoreinrichtung 150 reflektiert wird (Detektion).

In dieser Abbildung wird das Licht von der ersten Lichtquelle 110 über die Feldlinse 111, den Beleuchtungseinkoppler 113 und die Abbildungsoptik 132 auf die Probe 140 gerichtet. Der Beleuchtungseinkoppler ist hier ein Prismenstrahlteiler oder ein teildurchlässiger Spiegel mit einer Durchlässigkeit von beispielsweise 50%. Um diesen Lichtweg zeitweise abzuschirmen, kann ein Shutter 112 eingebaut werden oder der Beleuchtungseinkoppler 113 wird schalt- oder schwenkbar ausgeführt.

Die räumlich dreidimensionale aufgelöste Bildaufnahme mit einem optischen Abbildungssystem 100 gemäß der Abbildung 1 erfolgt durch wechselweise Probenabbildung mit den folgenden Einstellungen:

In einem ersten Abbildungsmodus wird entweder mit dem Shutter 112 oder dem schaltbaren Beleuchtungseinkoppler 113 die Beleuchtung mit der ersten Lichtquelle 110 freigegeben, so

daß die gesamte Probe über den Beleuchtungseinkoppler 113 beleuchtet wird. Gleichzeitig werden alle Spiegel 121 des DMDs 120 in die Detektions-Stellung 121b geschwenkt, so daß kein Licht von der Lichtquelle 160 auf die Probe 140 gelangt und die Abbildung der gesamten Probe auf die Detektoreinrichtung 150 gegeben ist (Erfassung des ersten, konventionellen Teilbildes).

In einem zweiten Abbildungsmodus wird der Lichtweg von der ersten Lichtquelle 110 zur Probe 140 durch den Shutter 112 oder den schaltbaren Spiegel 113 abgeblockt. Die Probe 140 wird nun über die in Beleuchtungs-Stellung 121a geschwenkten Spiegel 121 des DMDs 120 mit der Lichtquelle 160 beleuchtet. Welche Spiegel 121 des DMDs 120 in zeitlicher Reihenfolge in die Beleuchtungsposition geschwenkt werden und welche Punkte in der Fokalebene der Probe 140 beleuchtet werden, hängt vom jeweiligen Modulationsmuster ab. Das Modulationsmuster bestimmt, mit welcher zeitabhängigen Beleuchtungssequenz bzw. welchem zeitabhängigen Aperturmuster die Fokalebene der Probe 140 beleuchtet wird. Das Modulationsmuster kann beispielsweise auf einer sogenannten Pseudo-Zufallssequenz mit endlicher Länge, einer Hadamard-Sequenz vom S-Matrix-Typ oder einer Zufallssequenz basieren. Es können insbesondere sämtliche Sequenzen implementiert werden, die in EP 0 911 667 A1 und WO 97/31282 beschrieben sind.

Während dieser zweiten Phase der Probenabbildung wird die Probe 140 durch die Abbildung der Mikrospiegel 121 in die Fokalebene mit zeitabhängigen Modulationsmustern beleuchtet. Simultan wird das in der übrigen Probe 140 emittierte Licht (Streulicht und Fluoreszenzlicht) über die Abbildungsoptik 130 und die in Detektions-Position 121b geschwenkten Mikrospiegel 121 zur Detektoreinrichtung 150 gelenkt. Die Detektorkamera 153 nimmt ein zweidimensionales

Bild der Probe 140 auf, wobei in der Fokalebene zu jedem Zeitpunkt nur aus denjenigen Punkten Licht detektiert wird, die jeweils nicht beleuchtet werden. Dieses zweite Teilbild besteht somit im wesentlichen aus den Hintergrundbeiträgen.

Schließlich werden die bei der ersten bzw. zweiten Probenaufnahme ermittelten Teilbilder zur Ermittlung eines Bildes der Fokalebene ausgewertet. Dazu wird das Differenzbild aus dem ersten und zweiten Teilbild berechnet. Auch wenn die beiden Lichtquellen 110 und 160 durch Lampen gleicher Bauart gebildet werden, kann es durch Justageabweichungen zu Unterschieden in der Probenbeleuchtung kommen. Vorzugsweise werden daher bei der Differenzbildung die Signale der Teilbilder zunächst derart gewichtet, daß sich die in beiden Teilbildern enthaltenen Signalanteile außerhalb der Fokalebene gegenseitig auslöschen. Hierzu kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Anstelle der zu untersuchenden Probe 140 wird hierzu ein Testobjekt in Form einer streuenden oder fluoreszierenden ebenen Scheibe oder eines anderen beliebigen, möglichst homogen streuenden oder fluoreszierenden Objektes außerhalb der Fokalebene angeordnet. Das Testobjekt wird abwechselnd mit der ersten und zweiten Lichtquelle 110 und 160 beleuchtet und es werden die jeweiligen Signalverteilungen entsprechend der zwei Abbildungsmodi aufgenommen. Aus dem Quotienten der Signalverteilungen ergeben sich entsprechende Normierungsfaktoren, die bei der genannten Differenzbildung berücksichtigt werden. Es werden für das gesamte Bild ein gemeinsamer Normierungsfaktor oder spezifische Normierungsfaktoren für einzelne Bildpunkte oder Bildpunktgruppen ermittelt.

Eine alternative Ausführungsform eines erfindungsgemäßen optischen Abbildungssystems 100 ist in Figur 2 gezeigt. Bei

dieser Ausführungsform ist lediglich eine Lichtquelle 170 vorgesehen, deren Licht wahlweise über die Feldlinse 171, den schalt- oder schwenkbar ausgeführten Beleuchtungseinkoppler 172 und die Abbildungsoptik 131 oder über den Umlenkspiegel 173, die in Beleuchtungsposition geschwenkten Mikrospiegel 121 des DMDs 120 und die Abbildungsoptik 130 zur Probe gelenkt wird. Im ersten Fall erfolgt die konventionelle Beleuchtung der Gesamtprobe über den als Prismenstrahlteiler oder teildurchlässigen Spiegel ausgeführten Beleuchtungseinkoppler 172, wie dies bereits für Figur 1 (Lichtquelle 110) beschrieben wurde.

Während der zweiten Phase der Probenabbildung erfolgt die Beleuchtung über die in die Beleuchtungsposition 121a geschwenkten Mikrospiegel 121 des DMDs 120, wie dies bereits beschrieben wurde, während mittels der Detektoreinrichtung 150 Licht aus den nicht beleuchteten Bereichen der Fokalebene aufgezeichnet wird. Zur Abblockung des in den Abbildungsphasen jeweils nicht verwendeten Lichtweges werden alle Elemente des DMD 120 in die Detektionsposition 121b geschwenkt oder der Beleuchtungseinkoppler 172 aus dem Strahlengang gebracht. Auch wenn in Figur 2 nicht dargestellt, so ist wahlweise ein Aufbau mit Shuttern möglich. Im übrigen entspricht das Abbildungssystem 100 gemäß Figur 2 der oben beschriebenen ersten Ausführungsform, so daß die einzelnen Komponenten mit den gleichen Bezugszeichen wie oben bezeichnet sind. Das Bezugszeichen 174 verweist auf einen Shutter. Als Shutter werden vorzugsweise elektromechanische Shutter (z.B. Blenden oder Schwenkspiegel, betätigt z.B. mit Elektromotoren oder Hubmagneten) verwendet.

Die Probenabbildung erfolgt ebenfalls, wie dies oben beschrieben wurde, indem zwei Teilbilder entsprechend der zwei Abbildungsmodi aufgezeichnet und anschließend zu einem

räumlich dreidimensional aufgelösten Bild der Probe verrechnet werden. Der DMD 120 wird wiederum entsprechend den bereits genannten Modulationsmustern angesteuert.

Eine weitere Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Abbildungssystem 200 mit einer teildurchlässigen und teilreflektierenden rotierenden Maske ist in Figur 3 gezeigt. Es umfaßt eine Lichtquelle 210, eine Maske 220 als Beleuchtungsmodulator, eine Abbildungsoptik 230 und eine Detektoreinrichtung 250 bestehend aus einer Abbildungsoptik 251, einem Filter 252 und einer Detektorkamera 253. Das Bezugszeichen 240 verweist auf eine Probe, die mit dem Abbildungssystem 200 abgebildet werden soll.

Die Lichtquelle 210 beleuchtet über die Feldlinse 211 die Maske 220, die mit der Beleuchtungsoptik 230 in die Probe 240 abgebildet wird. In der Fokalebene der Probe 240 ergibt sich somit ein Beleuchtungsmuster, welches dem auf der Maske 220 aufgeprägten Reflektionsmuster entspricht. Das von der Probe 240 emittierte Licht wird mit der Abbildungsoptik 230 auf die Maske 220 abgebildet. Mit der Abbildungsoptik 251 wird die Maske 220 auf die Detektorkamera 253 abgebildet. Ähnlich wie die Abbildungsoptik 151 kann die Abbildungsoptik 251 sowohl aus refraktiven als auch reflektiven Elementen aufgebaut sein. Die hier beschriebenen Abbildungsmodi unterscheiden sich durch die optischen Eigenschaften einzelner Teilbereiche (Sektoren) der Maske 220. Eine bevorzugte Ausführungsform der Maske 220 ist im unteren Teil von Figur 3 gezeigt.

Ein erster Abbildungsmodus ergibt sich dadurch, daß der homogene teilreflektierende Sektor a der Maske 220 zur gleichmäßigen konventionellen Beleuchtung der Probe 240 verwendet wird. Das von der Probe 240 emittierte Licht kann zum Teil den homogenen Sektor der Maske 220 passieren und

wird auf die Detektorkamera 253 abgebildet (Erfassung des konventionellen Teilbildes).

Für den zweiten Abbildungsmodus wird ein Sektor b der Maske 220 verwendet, auf dem, z. B. mittels photolithographischer Techniken, die vorgenannten Modulationsmuster aufgeprägt wurden. Voll verspiegelte und vollständig transmittierende Zonen sind hier entsprechend dem gewünschten Modulationsmuster angeordnet. Das Modulationsmuster kann wie in den zuvor beschriebenen Ausführungsformen gewählt werden, also beispielsweise als Pseudo-Zufallszahlensequenz. Durch die Rotation der Maske 220 ergibt sich aus der lateralen Anordnung der Aperturmuster auf der Scheibe 220 eine zeitabhängige Beleuchtungssequenz für die einzelnen Punkte der Fokalebene. Für das von der Probe 240 emittierte und mit der Abbildungsoptik 230 auf die Maske 220 abgebildete Licht wirkt diese Maske 220 derart, daß nur Licht aus gerade nicht beleuchteten Punkten durch die Maske hindurchtreten und mit der Detektoreinrichtung 250 aufgezeichnet werden kann. Das mit der Detektorkamera 253 aufgezeichnete zweite Teilbild besteht somit im wesentlichen aus den unerwünschten Hintergrundbeiträgen.

Die weitere Bildverarbeitung zur Gewinnung eines dreidimensional aufgelösten Bildes der Fokalebene der Probe 240 aus den zwei Teilbildern wird nach den weiter oben beschriebenen Methoden durchgeführt. Bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen optischen Abbildungssystems können die Positionen der Beleuchtungseinrichtung 210, 211 und der Detektoreinrichtung 250 wahlweise ohne weitere Veränderungen gegeneinander vertauscht werden.

Eine weitere alternative Ausführungsform eines erfindungsgemäßen optischen Abbildungssystems 300 für Untersuchungen in Transmissionsgeometrie ist in Figur 4 dargestellt. Es

umfaßt eine Lichtquelle 310, die über eine Feldlinse 311 einen Beleuchtungsmodulator 320 beleuchtet. Dieser wird über eine Abbildungsoptik 330 in die Fokalebene in der Probe 340 abgebildet. Eine zweite Abbildungsoptik 331 bildet diese Fokalebene in der Probe 340 auf einen Detektionsmodulator 350 ab, der über eine Abbildungsoptik 361 und einen Filter 362 auf eine Detektorkamera 363 abgebildet wird.

Die Lichtquelle 310 ist beispielsweise eine gefilterte Weißlichtlampe oder ein gefilterter Laser. Die Modulatoren 320, 350 sind hier als LCDs ausgeführt. Für Fluoreszenzanwendungen wird mit dem Filter 362 die Emission der Probe 340 herausgefiltert.

Für das in einem ersten Abbildungsmodus aufgezeichnete konventionelle Teilbild werden alle Pixel der LCDs 320, 350 auf Transmission gestellt, so daß die Probe 340 gleichmäßig beleuchtet und mit der Detektorkamera 363 ein konventionelles erstes Teilbild aufgezeichnet wird.

In einem zweiten Abbildungsmodus wird die Transmission der Elemente des Beleuchtungsmodulators 320 beispielsweise nach den oben beschriebenen Modulationsmustern variiert und dadurch die Punkte der Fokalebene der Probe 340 mit den entsprechenden zeitabhängigen Beleuchtungssequenzen beleuchtet. Während dieser Phase wird die Transmission der Elemente des Detektionsmodulators 350 derart gesteuert, daß nur Licht aus den zum jeweiligen Zeitpunkt nicht direkt beleuchteten Punkten der Fokalebene der Probe zur Detektoreinrichtung 360 gelangt. Dieses mit der Detektorkamera 363 aufgezeichnete zweite Teilbild enthält die Hintergrundbeiträge. Die Gewinnung eines dreidimensional aufgelösten Bildes der Fokalebene der Probe 340 aus den zwei Teilbildern wird nach den weiter oben beschriebenen Methoden durchgeführt.

Das erfindungsgemäße optische Abbildungssystem kann sowohl als eigenständiges Gerät, als auch als Zusatz zu einem verfügbaren Mikroskop realisiert werden. Der DMD-Beleuchtungsmodulator kann beispielsweise mit einem „DLP XGA Electronics Subsystem Kit“ (Hersteller: Texas Instruments, Dallas, TX, USA) realisiert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur optischen Abbildung einer Probe (140), mit den Schritten:

- gleichmäßige Beleuchtung der gesamten Probe (140) und Aufnahme eines konventionellen ersten Teilbildes,
- lateral strukturierte Beleuchtung der Probe (140) in einer Fokalebene, bei der die Beleuchtung der einzelnen Punkte der Fokalebene nach vorbestimmten zeitlichen Sequenzen variiert wird, und Aufnahme eines zweiten Teilbildes durch Erfassung des emittierten Lichtes, das von den in der Konfokalebene jeweils nicht beleuchteten Objektpunkten in der Probe ausgeht, und
- Ermittlung eines dreidimensional räumlich aufgelösten Bildes der Probe (140) durch Verrechnung des ersten und zweiten Teilbildes.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Verrechnung des ersten und zweiten Teilbildes unter Anwendung einer gewichteten Subtraktion erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die strukturierte Beleuchtung der Probe (140) unter Verwendung eines Beleuchtungsmodulators mit einer Vielzahl von Beleuchtungsaperturen erfolgt, der mit einem vorbestimmten oder zufälligen Modulationsmuster angesteuert wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem als Beleuchtungsmodulator ein DMD (120) mit einer Vielzahl von einzeln ansteuerbaren Mikrospiegeln (121) oder ein LCD (320) verwen-

det wird, bei dem die Transmission der Pixel einzeln angesteuert wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die strukturierte Beleuchtung der Probe unter Verwendung einer Maske (220) in Transmission oder Reflexion erfolgt.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das dreidimensional räumlich aufgelöste Bild durch Differenzbildung aus den zwei Teilbildern ermittelt wird, wobei das erste und/oder zweite Teilbild derart gewichtet wird, daß bei der Differenzbildung die Bildanteile von außerhalb der Fokalebene der Probe sich im Wesentlichen gegenseitig aufheben.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Aufnahme des ersten und zweiten Teilbildes eine einzelne (170) oder zwei getrennte Lichtquellen (110, 160) verwendet werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem das verwendete Modulationsmuster

- aus einer einzelnen systematisch verschobenen Zeile oder aus mehreren Zeilen besteht, die regelmäßig, entsprechend einer Pseudo-Zufallssequenz endlicher Länge, einer Hadamard-Sequenz oder einer Zufallssequenz angeordnet sind,
 - sich aus regelmäßigen Punkt- oder Linienmustern zusammensetzt,
 - aus Zufallsmustern besteht,
 - aus auf so genannten Walsh, Sylvester, Hadamard oder Golay Sequenzen basierenden Pseudo-Zufallsmustern endlicher Länge besteht,
 - aus einer wiederholten Anordnung von Mustern, die sich aus den Zeilen oder Spalten einer zyklischen Hadamard-Matrix ergeben, besteht, oder
- aus einer Kombination der vorgenannten Muster besteht.

9. Optisches Abbildungssystem (100), das mindestens eine Lichtquelle (110, 160, 170), eine Detektoreinrichtung (150) und einen Beleuchtungsmodulator (120) mit einer Vielzahl von einzeln ansteuerbaren Modulatorelementen (121) umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Beleuchtungseinkoppler zur gleichmäßigen Beleuchtung der gesamten Probe (140) in einem ersten Abbildungsmodus vorgesehen ist, wobei die Detektoreinrichtung (150) im ersten Abbildungsmodus zur Aufnahme eines konventionellen Teilbildes der Probe (140) eingerichtet ist, und
- die Modulatorelemente (121) mindestens zwei Gruppen von Modulatorelementen aufweisen, von denen in einem zweiten Abbildungsmodus eine erste Gruppe von Modulatorelementen (Beleuchtungs-Elemente) Licht von einer Lichtquelle (160, 170) in die Probe (140) lenken und eine zweite Gruppe von Modulatorelementen (Detektions-Elemente) Licht aus jeweils nicht beleuchteten Bereichen der Fokalebene der Probe (140) zur Detektoreinrichtung (150) lenken.
10. Abbildungssystem gemäß Anspruch 9, bei dem der Beleuchtungsmodulator durch einen DMD-Reflektor (120) mit einer Vielzahl von matrixartig angeordneten, verschwenkbaren Spiegeln (121) gebildet wird.
11. Abbildungssystem gemäß Anspruch 9, bei dem die Beleuchtungseinrichtung so aufgebaut ist, daß die Probe (140) von der Lichtquelle (170) entweder gleichmäßig über Beleuchtungseinkoppler (172) oder über den Umlenkspiegel (173) und den Beleuchtungsmodulator in der Fokalebene strukturiert beleuchtet wird.
12. Abbildungssystem gemäß Anspruch 9, bei dem zwei Lichtquellen (110, 160) vorgesehen sind und die Beleuchtungseinrichtung so aufgebaut ist, daß die Probe (140) entweder von der ersten Lichtquelle (110) über den Beleuchtungseinkopp-

ler (113) gleichmäßig beleuchtet wird, oder daß die Probe (140) über die zweite Lichtquelle (160) und den Beleuchtungsmodulator (120) in der Fokalebene strukturiert beleuchtet wird.

13. Abbildungssystem gemäß Anspruch 11 oder 12, bei dem die Beleuchtungseinrichtung Shutter (112, 174) aufweist, die zur Abschirmung von Beleuchtungsstrahlengängen vorgesehen sind.

14. Optisches Abbildungssystem (200), das mindestens eine Lichtquelle (210), eine Maske (220) mit verschiedenen Sektoren und eine Detektoreinrichtung (250) umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Sektor (a) der Maske (220) für eine gleichmäßige Beleuchtung der Probe (240) in einem ersten Abbildungsmodus vorgesehen ist, wobei im ersten Abbildungsmodus die Detektoreinrichtung (250) zur Aufnahme eines konventionellen Teilbildes der Probe (240) eingerichtet ist, und ein Sektor (b) der Maske (220) verschiedene Zonen aufweist, wobei in einem zweiten Abbildungsmodus eine erste Gruppe der Zonen Licht von der Lichtquelle (210) zur strukturierten Beleuchtung der Fokalebene in die Probe (240) lenkt und eine zweite Gruppe von Zonen Licht von den jeweils nicht beleuchteten Bereichen der Fokalebene der Probe (240) zur Detektoreinrichtung (250) lenkt.

15. Abbildungssystem gemäß Anspruch 14, bei dem die Maske (220) aus mindestens einem teilverspiegelten Sektor (a) und mindestens einem Sektor (b) besteht, in dem die erste Gruppe von Zonen verspiegelt und die zweite Gruppe von Zonen transparent ist.

16. Abbildungssystem gemäß Anspruch 14, bei dem die Maske (220) als eine rotierende Scheibe ausgeführt ist.

17. Optisches Abbildungssystem (300), das mindestens eine Lichtquelle (310), einen Beleuchtungs- und einen Detektionsmodulator (320, 350) mit jeweils einer Vielzahl von einzeln ansteuerbaren Modulatorelementen und eine Detektoreinrichtung (360) umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine gleichmäßige Beleuchtung einer Probe (340) in einem ersten Abbildungsmodus vorgesehen ist, wobei im ersten Abbildungsmodus die Detektoreinrichtung (360) zur Aufnahme eines konventionellen Teilbildes der Probe (340) eingerichtet ist und die einzelnen Modulatorelemente des Detektions- und des Beleuchtungsmodulators (320, 350) in einem zweiten Abbildungsmodus so gesteuert werden, daß eine Gruppe von Modulatorelementen des Beleuchtungsmodulators Licht von der Lichtquelle (310) in die Probe (340) lenken und eine Gruppe von Modulatorelementen des Detektionsmodulators (350) Licht aus jeweils nicht beleuchteten Bereichen der Fokalebene der Probe (340) zur Detektoreinrichtung (360) lenken.

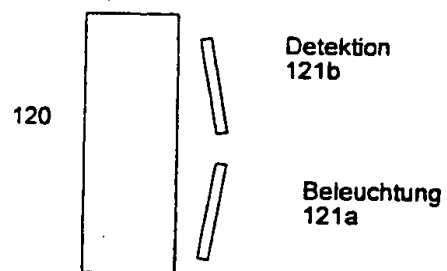
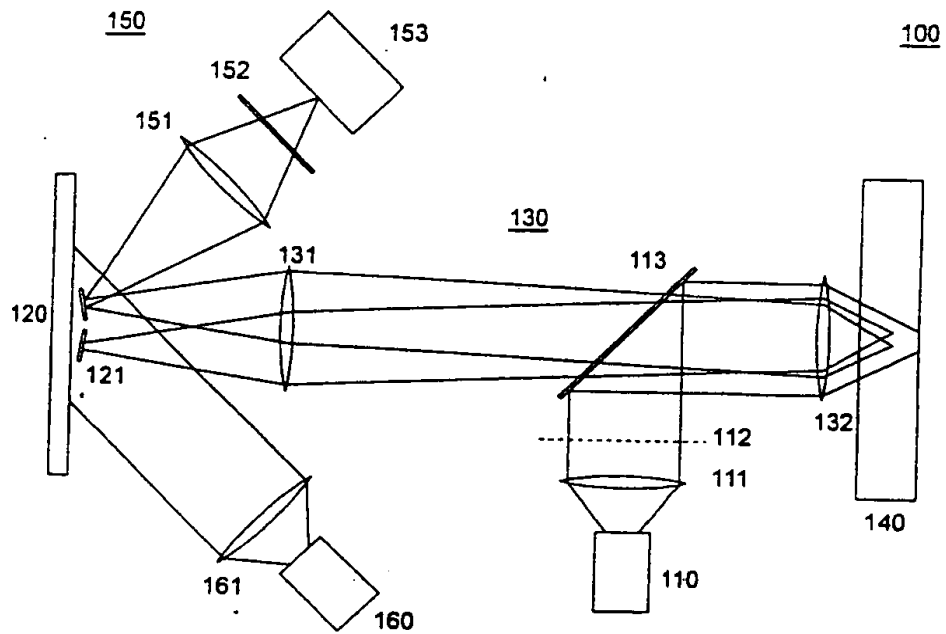
18. Abbildungssystem gemäß Anspruch 17, bei dem der Beleuchtungsmodulator (320) und/oder der Detektionsmodulator (350) durch einen DMD-Reflektor gebildet wird.

19. Abbildungssystem gemäß Anspruch 17, bei dem der Beleuchtungsmodulator (320) und/oder der Detektionsmodulator (350) durch einen LCD gebildet wird.

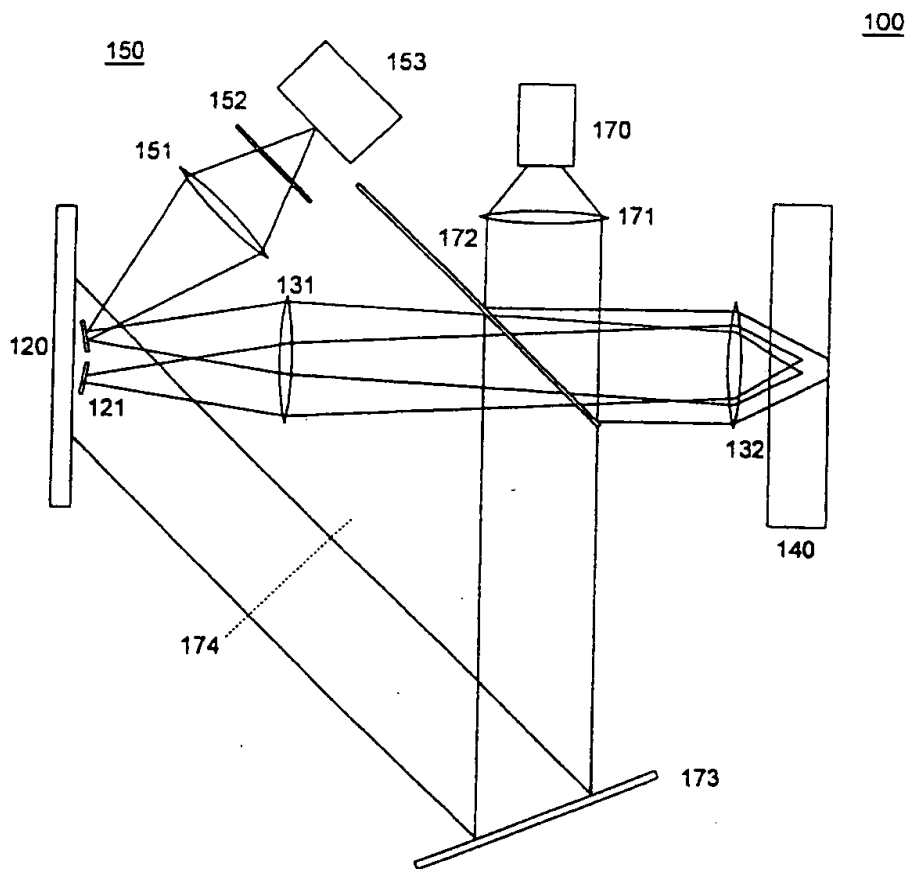
20. Abbildungssystem gemäß Anspruch 17, bei dem der Beleuchtungsmodulator (320) und/oder der Detektionsmodulator (350) durch eine Maske gebildet wird.

21. Abbildungssystem gemäß den Ansprüchen 10 oder 18, bei dem die Optik (161, 151, 311, 330, 331, 361) zur Beleuchtung oder Abbildung des DMDs (120, 320 oder 350) ein Offner-Triplett ist oder ein Offner-Triplett verwendet wird.

22. Abbildungssystem gemäß dem Anspruch 14, bei dem die Optik (211, 251) zur Beleuchtung oder Abbildung der Maske (220) ein Offner-Triplett ist oder ein Offner-Triplett verwendet wird.



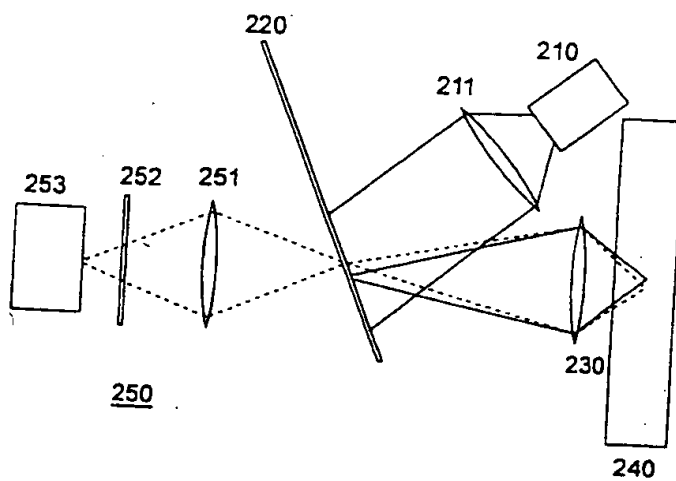
FIGUR 1



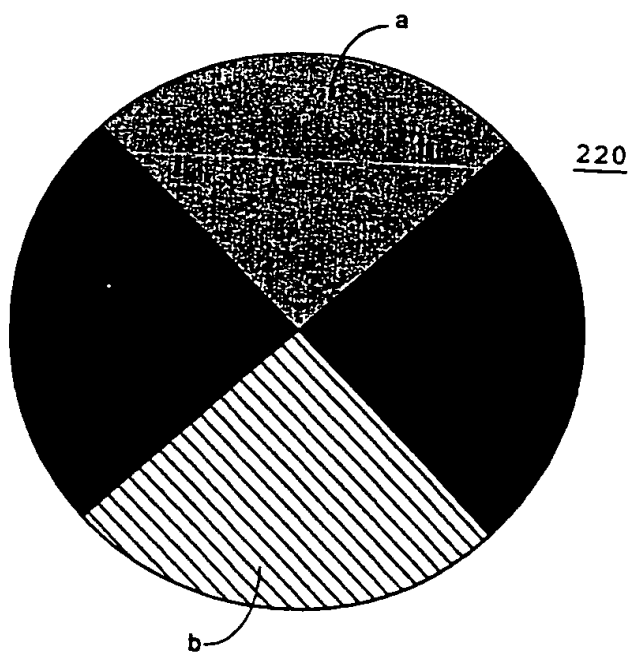
FIGUR 2

3/4

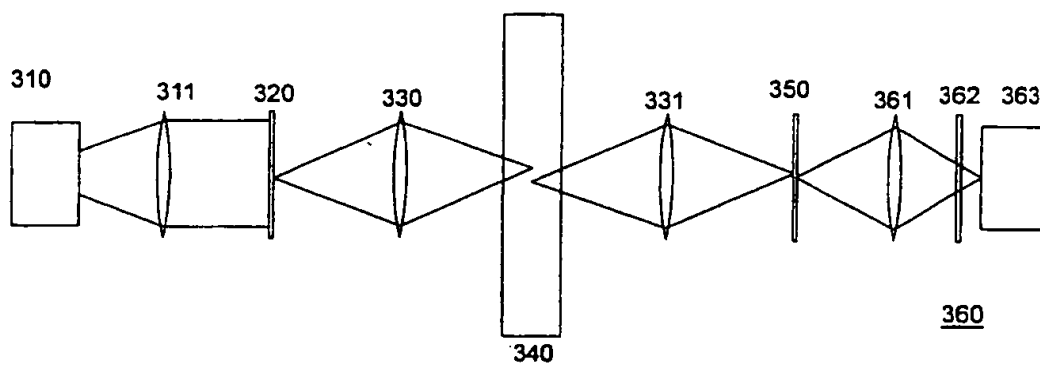
200



FIGUR 3



300



FIGUR 4